

## 牛种布鲁氏菌 RpoE2 蛋白部分生物学特性研究

董浩<sup>1,2</sup> 董礼华<sup>3</sup> 彭小薇<sup>1,4</sup> 王宁<sup>1</sup> 曲萍<sup>2</sup> 孙雨<sup>2</sup> 赵柏林<sup>2</sup>

胡冬梅<sup>2</sup> 石慧<sup>2</sup> 王晓英<sup>2</sup> 宋晓晖<sup>2\*</sup> 吴清民<sup>1\*</sup>

(1. 中国农业大学 动物医学院,北京 100193;

2. 中国动物疫病预防控制中心,北京 102600;

3. 乳山市夏村镇畜牧兽医工作站,山东 乳山 264500;

4. 中国兽医药品监察所,北京 100081)

**摘要** 为探讨牛种布鲁氏菌 sigma 因子 RpoE2 的功能,采用酵母双杂交技术对 RpoE2 蛋白与 anti-sigma 因子之间的互作进行研究;通过环境应激试验评价了 *rpoE2* 缺失株对强氧化环境、酸性 pH、杀菌性阳离子多肽、铁缺乏环境的耐受能力;通过比较亲本菌株和缺失株在巨噬细胞感染模型和小鼠感染模型中的生存能力,研究了 *rpoE2* 基因是否与牛种布鲁氏菌毒力相关。结果显示:牛种布鲁氏菌的 RpoE2 蛋白可以与 anti-sigma 因子相互作用,牛种布鲁氏菌 *rpoE2* 基因缺失后,对各种应激环境的耐受能力均无影响,并且巨噬细胞和小鼠感染模型中毒力均不降低。牛种布鲁氏菌的 RpoE2 蛋白是一个 ECF16 家族的 sigma 因子,并且其与布鲁氏菌的毒力无关。

**关键词** 牛种布鲁氏菌;ECF16 家族 sigma 因子;毒力;环境应激

中图分类号 S852.61<sup>+</sup>4

文章编号 1007-4333(2017)01-0041-07

文献标志码 A

## Study on biological characteristic of RpoE2 in *Brucella abortus*

DONG Hao<sup>1,2</sup>, DONG Lihua<sup>4</sup>, PENG Xiaowei<sup>1,3</sup>, WANG Ning<sup>1</sup>, QU Ping<sup>2</sup>, SUN Yu<sup>2</sup>,  
ZHAO Bolin<sup>2</sup>, HU Dongmei<sup>2</sup>, SHI Hui<sup>2</sup>, WANG Xiaoying<sup>2</sup>, SONG Xiaohui<sup>2\*</sup>, WU Qingmin<sup>1\*</sup>

(1. College of Veterinary Medicine, China Agriculture University, Beijing 100193, China;

2. China Animal Disease Control Centre, Beijing 102600, China;

3. Animal Husbandry and Veterinary Station of Xiacun County, Rushan 264500, China;

4. China Institute of Veterinary Drug Control, Beijing 100081, China)

**Abstract** To investigate the function of RpoE2 in *Brucella abortus*, yeast two-hybrid system was used to verify the interaction between RpoE2 and anti-sigma factor. Stress response assays were also performed to evaluate if the *rpoE2* mutant tolerance to various stresses (oxidative stress, detergents, antimicrobial peptides, extreme pH, and iron limited). The survival ratios of *rpoE2* mutant and WT in both J774A.1 cell and mouse infection model were also investigated. The results showed that RpoE2 interacted with anti-sigma factor, and the *rpoE2* null mutant was not defective for the resistance to various stresses. Moreover, the survival ratio of all *Brucella* wild type strain and its mutant was almost the same in both macrophage and mice infection models. All these data demonstrated that RpoE2 was an ECF 16 sigma factor, and not involved in bacterial virulence in *B. abortus*.

**Keywords** *Brucella abortus*; ECF16 sigma factor; virulence; stress response

ECF sigma 因子是一类新发现的转录调控因子,当存在特定的环境信号时,ECF sigma 因子可以

在转录水平上调控大量基因的表达。和  $\sigma 70$  蛋白家族成员相比,ECF sigma 因子只含有  $\sigma 2$  和  $\sigma 4$  2 个

收稿日期:2016-01-11

基金项目:国家 973 项目(2010CB530202);国家自然科学基金资助项目(30871882)

第一作者:董浩,兽医师,主要从事布鲁氏菌防控技术研究,E-mail:tunghao@163.com

通讯作者:吴清民,教授,主要从事布病防控技术研究,E-mail:wuqm@cau.edu.cn

宋晓晖,副研究员,主要从事草食动物与人畜共患病防控技术研究,E-mail:songxiaohui0523@163.com

保守的功能区,而缺乏 $\sigma 3$ 功能区<sup>[1]</sup>。根据序列同源性、anti-sigma因子的结构、保守的结合区域等特征,ECF sigma因子可以划分为40个以上的家族。这些不同的ECF sigma因子家族,往往在细菌中发挥着不同的功能:ECF01-04家族与细菌耐受外膜应激密切相关;ECF05-10家族与细菌获取铁元素有关;ECF11-15家族与细菌感应胞质应激环境相关<sup>[2]</sup>。

目前,只有2个ECF16 sigma因子的功能有相关的报道:在新月柄杆菌(*Caulobacter crescentus*)中SigF与细菌在稳定期抵御氧化应激相关<sup>[3]</sup>;在慢生根瘤菌(*Bradyrhizobium japonicum*)中EcfS在根瘤菌与大豆建立共生关系的过程中发挥着重要作用<sup>[4]</sup>。

在布鲁氏菌基因组中,只含有2个ECF sigma因子:1个ECF15 sigma因子(RpoE1)和1个ECF16 sigma因子(RpoE2)<sup>[5]</sup>。早期的研究表明,在羊种布鲁氏菌16M中,*rpoE1*基因缺失后,布鲁氏菌的毒力降低,并且该sigma因子还调控着细菌鞭毛的表达<sup>[5-6]</sup>。在牛种布鲁氏菌2308中,*rpoE1*基因缺失后,缺失株对强氧化应激环境和酸性环境的耐受能力降低,且在小鼠感染模型中毒力降低<sup>[7]</sup>。然而牛种布鲁氏菌中的另一个ECF sigma因子却少有研究。

本试验通过酵母双杂交、环境应激试验、毒力试验对牛种布鲁氏菌RpoE2蛋白功能进行了研究,发现该sigma因子与布鲁氏菌耐受环境应激和细菌毒力均不相关,这些结果为研究其他细菌中ECF16家族sigma因子的功能提供了一些有价值的信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌株、细胞及实验动物

牛种布鲁氏菌2308、*E. coli* DH5 $\alpha$ 由本实验室保存,牛种布鲁氏菌*rpoE2*基因缺失株 $\Delta RpoE2$ 及其互补菌株*CRpoE2*为本实验室构建。Y2H Gold酵母菌株、pGBKT7质粒、pGADT7质粒购自于Clontech公司(美国)。小鼠腹腔巨噬细胞J774A.1细胞为本实验室保存。6~8周龄的雌性BALB/c小鼠购自北京金牧阳实验动物养殖有限责任公司。

### 1.2 试剂

YPDA购自北京泛基诺科技有限公司;YNB购自于BD公司(美国);硫酸腺嘌呤(Ade)购自中科瑞泰(北京)生物科技有限公司;金担子素(AbA)购自

于TAKARA公司(日本);X- $\alpha$ -Gal和二甲基甲酰胺、庆大霉素购自Amresco公司(美国);缺陷型氨基酸添加剂、10 $\times$  TE buffer、10 $\times$  LiAc溶液及PEG3350均购自于Clontech公司(美国)。其余未特别注明的试剂均购自北京广达恒益科技有限公司。

### 1.3 细菌的培养

牛种布鲁氏菌野生株2308、*rpoE2*基因缺失株 $\Delta RpoE2$ 及其互补菌株*CRpoE2*接种于TSB培养基,于37 $^{\circ}$ C恒温水浴摇床培养至对数期。

### 1.4 *rpoE2*基因缺失株的构建

1) *rpoE2*基因自杀载体的构建。在*rpoE2*基因片段上游及下游分别选取约500 bp的同源臂片段,采用Primer5.0分别设计上游同源臂的扩增引物(GGGGTACCGCGGGTAACAGGGATT和CATGGCAGAGAATTC CCTCTCTTCATTAGAACG)和下游同源臂的扩增引物(GAATTCTCTGCCATGGGTCAATGCCAT和CGGGATCC CAGGACGGCAAGCAACAGC)。以牛种布鲁氏菌2308株的基因组为模板,使用上述引物分别扩增*rpoE2*基因的上下游同源臂片段。反应程序如下:94 $^{\circ}$ C预变性3 min,首先进行20个循环,94 $^{\circ}$ C变性30 s,65 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸45 s,每个循环退火温度下降0.5 $^{\circ}$ C。之后进行10个循环,94 $^{\circ}$ C变性30 s,55 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸45 s,72 $^{\circ}$ C最终延伸10 min。PCR产物进行电泳并回收PCR产物。

以回收的*rpoE2*基因上下游同源臂PCR产物作为模板,使用上游同源臂的上游引物和下游同源臂的下游引物进行重叠PCR,连接同源臂。反应程序如下:94 $^{\circ}$ C预变性3 min,首先进行20个循环,94 $^{\circ}$ C变性30 s,60 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸45 s,每个循环退火温度下降0.5 $^{\circ}$ C。之后进行10个循环,94 $^{\circ}$ C变性30 s,50 $^{\circ}$ C退火30 s,72 $^{\circ}$ C延伸45 s,72 $^{\circ}$ C最终延伸10 min。PCR产物跑胶,回收。

通过位于同源臂两端的*Kpn*I和*Bam*H I酶切位点将*rpoE2*基因同源臂连入质粒pBluescript II KS(+ )载体中,获得*rpoE2*基因的自杀载体中间产物载体pBluescript II-*rpoE2*。通过上下游同源臂中的*Eco*R I酶切位点插入筛选标记*kan*<sup>r</sup>抗性基因,从而获得*rpoE2*基因的自杀载体pBluescript II-*rpoE2-kan*<sup>r</sup>。

2) 电转化布鲁氏菌。提取pBluescript II-*rpoE2-kan*<sup>r</sup>自杀质粒,电转入牛种布鲁氏菌野生株

2308 中,操作步骤如下:

①将牛种布鲁氏菌 2308 菌株培养至对数增长长期,收集菌体,使用预冷的灭菌纯水洗涤菌体 3 遍。最后使用适当体积的纯水重悬菌体。

②将自杀质粒(约 1  $\mu\text{g}$  DNA)和上述处理后的菌体 100  $\mu\text{L}$ (约  $10^9$ )加入电极杯(1 mm)中,将 MicroPulser Electroporation Apparatus (Bio-Rad) 设置为“Agr”程序,进行电转化。

③将电极杯取出,加入 37  $^{\circ}\text{C}$  预热的 SOC 培养基混匀,一并移入灭菌 EP 管内,37  $^{\circ}\text{C}$  复壮 12~18 h。

④吸上述培养后的菌液 100~200  $\mu\text{L}$  涂布于含有卡纳霉素抗生素的 TSB 固体平板上,37  $^{\circ}\text{C}$  倒置培养。

3) 牛种布鲁氏菌 2308 $\Delta rpoE2$  基因缺失株的筛选。选取 TSB/Km 平板上长出的单克隆于 TSB/Km 和 TSB/Amp 平板上划线,选择在 TSB/Km 平板上生长,TSB/Amp 平板上不生长的菌落进行菌落 PCR 鉴定。选取 PCR 阳性的菌落保存并用于下一步试验。

### 1.5 牛种布鲁氏菌 2308 $\Delta rpoE2$ 互补株 $CrpoE2$ 构建

选取  $rpoE2$  编码区及包含启动子序列在内的 5'UTR 片段,采用 Primer5.0 设计上下游引物  $CrpoE2F$  (CCCAAGCTTTTACTGACCGCTC-TTCAT) 和  $CrpoE2R$  (CGGGATCCTCATCGG-TCATCTT TCTTG)。使用 PCR 扩增  $rpoE2$  编码区及启动子序列,反应程序如下:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min,首先进行 20 个循环,94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,65  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s,每个循环退火温度下降 0.5  $^{\circ}\text{C}$ 。之后进行 10 个循环,94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,55  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 45 s,72  $^{\circ}\text{C}$  最终延伸 10 min。PCR 产物进行电泳并回收。

使用 *Hind* III 和 *Bam*H I 酶切位点将回收 PCR 产物连入质粒 PMR11,获得互补质粒 PMR11- $rpoE2$ 。将互补质粒电转入  $\Delta rpoE2$  缺失株中,电转步骤同上。将电转复壮后的菌液 100~200  $\mu\text{L}$  涂布于 TSB/Amp 固体平板上,37  $^{\circ}\text{C}$  倒置培养 3~5 d。选取 TSB/Amp 平板上的菌落进行菌落 PCR 鉴定。选取 PCR 阳性的菌落( $CrpoE2$ )保存并用于下一步试验。

### 1.6 酵母双杂交

使用酵母双杂交的方法检测 RpoE2 和 RpoE2 anti-sigma 因子之间的互作,在前人描述的方法上

做了一些改进<sup>[8]</sup>,具体操作如下:

1) 双杂交体系载体构建。① pGBKT7-RpoE2 载体构建。选取 RpoE2 编码区(BABII0020)序列,采用 Primer5.0 分别设计上下游引物(CGGAA-TTCTTGAAGGCCCTGATGTTG 和 AACTGC-AGTCATCGGTCATCTTTCTTGC)。使用 PCR 扩增 RpoE2 的编码区序列,通过 *Eco*R I 和 *Pst* I 双酶切位点将 RpoE2 片段插入 pGBKT7 质粒中。② pGADT7-RpoE2 anti-sigma 因子载体构建。选取 RpoE2 anti-sigma 因子编码区(BABII0021),采用 Primer5.0 分别设计上下游引物(CGGAA-TT-CATGACCGATGACCTGATCAACC 和 CGGG-ATCCTTACCAGCGCAGGCAGAAG)。使用 PCR 扩增 RpoE2 anti-sigma 因子的编码区序列,通过 *Eco*R I 和 *Bam*H I 双酶切位点将 RpoE2 anti-sigma 因子片段插入 pGADT7 质粒中。

2) 质粒共转入酵母细胞。①分别提取阳性克隆中 pGBKT7-RpoE2 质粒和 pGADT7-RpoE2 anti-sigma 因子质粒,以及阴性对照空质粒 pGBKT7 和 pGADT7。②酵母感受态细胞制备。选择酵母 Y2H Gold 单克隆于 25 mL YPDA 培养基中 30  $^{\circ}\text{C}$  220 r/min 培养 16~18 h(OD<sub>600</sub> 大于 1.5)。将 25 mL 饱和菌液转移到 150 mL 的 YPDA 中,此时 OD<sub>600</sub> 约为 0.2~0.3,接着 30  $^{\circ}\text{C}$  220 r/min 继续培养 3 h,待 OD<sub>600</sub> 在 0.4~0.6 时,将 160 mL 酵母菌液分别倒入 4 个 50 mL 离心管中,1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,用无菌 ddH<sub>2</sub>O 40 mL 重悬,再 1 000 r/min 离心 5 min。用 1.5 mL 1 $\times$  TE/LiAc 1.5 mL 重悬,12 000 r/min 离心 15 s,弃上清;重复此步骤 1 次。用 600  $\mu\text{L}$  1 $\times$  TE/LiAc 重悬。共制得感受态细胞 3.5 mL。③质粒共转。将以下 6 组质粒:pGBKT7 质粒+pGADT7 质粒;pGBKT7-53 质粒+pGADT7-T 质粒;pGBKT7-Lam 质粒+pGADT7-T 质粒;pGBKT7-RpoE2 质粒+pGADT7 质粒;pGBKT7+pGADT7-RpoE2 anti-sigma 因子质粒;pGBKT7-RpoE2 质粒+pGADT7-RpoE2 anti-sigma 因子质粒一起转入酵母感受态细胞中。将 2 种质粒各 0.1  $\mu\text{g}$ 、变性后的 carrier DNA (100  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min)10  $\mu\text{L}$ 、感受态细胞 100  $\mu\text{L}$  一起加入 EP 管中,混匀。之后再加入 PEG/LiAc 600  $\mu\text{L}$ ,混匀。30  $^{\circ}\text{C}$  30 min,每 10 min 上下轻轻颠倒 5 次。之后加入 40  $\mu\text{L}$  DMSO,放入 42  $^{\circ}\text{C}$  水浴锅 15 min,每 5 min 上下轻轻颠倒 5 次。12 000 r/min

离心 15 s, 用 1 mL 0.9% 生理盐水重悬, 弃去 900  $\mu$ L, 再加入 900  $\mu$ L 0.9% 生理盐水, 取 100  $\mu$ L 分别涂于 DDO(SD/-Trp-Leu)、TDO(SD/-Trp-Leu-His)、QDO(SD/-Trp-Leu-His-Ade) 以及 QDO/A(SD/-Trp-Leu-His-Ade+AbA) 平板。于 30  $^{\circ}$ C 温箱培养 2~4 d, 注意观察菌落生长情况。

3) 检测互作活性强度。将在 QDO/A 平板上生长菌落于 QDO/A/X 的平板上划线, 30  $^{\circ}$ C 温箱培养 1~3 d, 注意观察菌落颜色的变化。

### 1.7 应激试验

1) 氧化应激试验。为检测 *rpoE2* 在氧化环境中是否影响牛种布鲁氏菌的生存, 将在 TSB pH 7.3 中培养的布鲁氏菌野生株和缺失株  $\Delta rpoE2$  调整为  $1 \times 10^9$  cfu/mL, 然后取 100  $\mu$ L 涂布于 TSA 平板, 在每个平板中间放置一片 5.5 mm 的无菌滤纸片, 往纸片上滴加 10  $\mu$ L 30% 的  $H_2O_2$  溶液, 于 37  $^{\circ}$ C 5%  $CO_2$  恒温培养箱中继续培养 72 h 后测量抑菌环直径。

2) 外膜应激试验。为了检测 *rpoE2* 在氧化环境中是否影响牛种布鲁氏菌的生存, 将在 TSB pH 7.3 中培养的布鲁氏菌野生株和缺失株  $\Delta rpoE2$  调整为  $1 \times 10^9$  cfu/mL, 然后取 100  $\mu$ L 涂布于 TSA 平板, 在每个平板中间放置一片 5.5 mm 的无菌滤纸片, 往纸片上滴加 10  $\mu$ L 10% 十二烷基硫酸钠 (SDS) 溶液或者 10 mg/mL 多粘菌素 B, 于 37  $^{\circ}$ C 5%  $CO_2$  恒温培养箱中继续培养 72 h 后测量抑菌环直径。

3) pH 应激试验。对 *rpoE2* 在 pH 应激中是否影响牛种布鲁氏菌的生存进行检测, 将在 TSB pH 7.3 中培养的布鲁氏菌野生株和缺失株  $\Delta rpoE2$  调整为  $1 \times 10^9$  cfu/mL, 然后取 100  $\mu$ L 涂布于 TSA 平板, 在每个平板中间放置一片 5.5 mm 的无菌滤纸片, 往纸片上滴加 10  $\mu$ L 1 mol/L NaOH, 或者 1 mol/L HCl, 于 37  $^{\circ}$ C 5%  $CO_2$  恒温培养箱中继续培养 72 h 后测量抑菌环直径。

4) 缺铁应激试验。为检测 *rpoE2* 是否影响到铁利用, 将在 TSB, pH 7.3 中培养的布鲁氏菌野生株和缺失株  $\Delta rpoE2$  按初始含量为 ( $1 \times 10^7$  cfu/mL) 接种于缺铁培养基 (TSB 中加入 10 mmol/L 2'-2'-联吡啶) 中培养 48 h。在处理 24 和 48 h 测定 cfu。

### 1.8 细胞试验

研究 RpoE2 对牛种布鲁氏菌 2308 体外毒力的

影响, 测定了牛种布鲁氏菌 2308 和其衍生菌株 (缺失株  $\Delta rpoE2$  及互补株 *CrpoE2*) 在 J774A.1 鼠源巨噬细胞中的增殖率<sup>[9]</sup>。

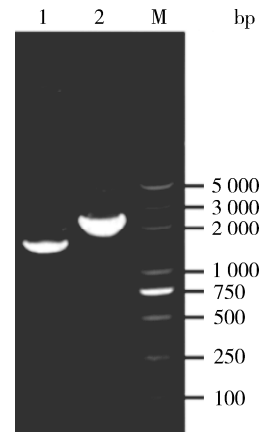
### 1.9 小鼠试验

研究 *rpoE2* 对牛种布鲁氏菌 2308 体内毒力的影响, 测定了牛种布鲁氏菌 2308 和其衍生菌株 (缺失株  $\Delta rpoE2$  及互补株 *CrpoE2*) 在 BALB/c 小鼠脾脏中的增殖率<sup>[9]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 *rpoE2* 基因缺失株构建及互补株构建

研究 *rpoE2* 基因的功能, 采用同源重组的方法构建了 *rpoE2* 基因缺失株。利用 *rpoE2* 基因的上游同源臂的上游引物和下游同源臂的下游引物对缺失株进行 PCR 检测。结果如图 1 所示, 缺失株 PCR 产物的大小为 2 439 bp, 而亲本菌株的 PCR 产物大小为 1 463 bp, 这表明 *rpoE2* 缺失株构建成功。



1 为  $\Delta rpoE2$  基因缺失株 PCR 扩增产物 (2 439 bp); 2 为对应基因的 2308 野生株 PCR 扩增产物 (1 463 bp); M 为核酸分子量标准。

1, PCR products of  $\Delta rpoE2$  mutant; 2, the corresponding negative control (2308 wide type); M, Marker.

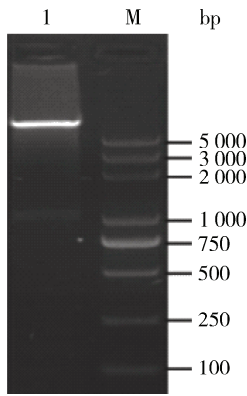
图 1  $\Delta rpoE2$  基因缺失株 PCR 鉴定

Fig. 1 PCR identification of  $\Delta rpoE2$  mutant

在构建 *rpoE2* 基因缺失株的同时, 也构建了 *rpoE2* 缺失株的互补菌株。采用 *Hind* III 和 *Bam*HI 双酶切的方法对 *rpoE2* 的互补载体进行鉴定。如图 2 所示, 经过双酶切可以获得大小为 979 bp 的目的片段。同时, 由于互补载体具有 Amp 抗性基因, 因此通过抗性筛选即获得互补菌株。

### 2.2 RpoE2 与假定 anti-sigma 因子互作的验证

根据 BAB2\_0020 序列分析发现其含有 2 个



1 为 PMR11-*rpoE2* 载体双酶切图谱;M 为核酸分子量标准。  
1, digestion of the PMR11-*rpoE2* plasmid; M, Marker.

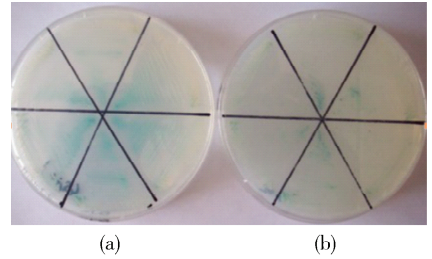
图 2 互补载体 pMR11-*rpoE2* 双酶切鉴定

Fig. 2 Digestion of PMR11-*rpoE2* complementary vector

Pfam 结构域: Sigma-70 region 2 (20-88 个氨基酸) 和 Sigma-70 region 4 (111-163 个氨基酸), 这 2 个结构域是 ECF $\sigma$  因子的典型特征。通过对 BAB2\_0020 相邻的 BAB2\_0021 基因进行序列分析发现, 其含有一个 DUF1109 Pfam (9-211 个氨基酸)。由于 ECF16 家族的 ECF $\sigma$  因子的主要特征就是其 anti-sigma 因子含有 1 个非常保守的 DUF1109 基序<sup>[2]</sup>, 由此推断如果 RpoE2 蛋白可以和 BAB2\_0021 的编码产物互作, 则可以证明 RpoE2 是一个 ECF16 家族的 ECF $\sigma$  因子。

通过酵母双杂交验证 RpoE2 和 BAB2\_0021 (假定的 RpoE2 互作蛋白) 之间的互作: 在将 6 组质粒: pGBKT7 质粒 + pGADT7 质粒; pGBKT7-53 质粒 + pGADT7-T 质粒; pGBKT7-Lam 质粒 + pGADT7-T 质粒; pGBKT7-RpoE2 质粒 + pGADT7 质粒; pGBKT7 + pGADT7-RpoE2 anti-sigma 因子质粒和 pGBKT7-RpoE2 质粒 + pGADT7-RpoE2 anti-sigma 因子质粒一起转入酵母感受态细胞后。所有组均可在 DDO、TDO 平板上生长, 转化效率基本一致, 但只有 pGBKT7-53 质粒 + pGADT7-T 质粒和 pGBKT7-RpoE2 质粒 + pGADT7-RpoE2 anti-sigma 因子质粒可以在 QDO 及 QDO/A 平板上生长。将这 2 组能够在 QDO/A 平板上生长的菌落在 QDO/A/X 平板上划线, 如图 3 所示, 阳性对照组 (pGBKT7-Lam 质粒 + pGADT7-T 质粒) (a) 和含有 2 个蛋白的载体 (pGBKT7-RpoE2 质粒 + pGADT7-RpoE2 anti-sigma 因子质粒) (b) 可以在 QDO/A/X 上呈现蓝色菌落。结果证明了 RpoE2

作为 sigma 因子的确能够和预测为 anti-sigma 因子 (BAB2\_0021) 互作。



(a) 共转入 pGADT7-T 和 pGBKT7-53 载体的 Y2H Gold 酵母在含有 X-a-Gal 和金担子素的四缺培养基上的生长情况; (b) 分别导入 RpoE2 和 anti-sigma 因子编码序列的 pGADT7 和 pGBKT7 载体的共转入 Y2HGold 酵母在含有 X-a-Gal 和金担子素的四缺培养基上的生长情况。

(a) Yeast strain Y2H Gold was transformed with the pGADT7-T and pGBKT7-53 (positive control), and re-streaked on SD medium lacking Trp, Leu, Ade, His containing X-a-Gal and aureobasidin A (b) The yeast strain Y2HGold was transformed with the pGADT7 and pGBKT7 derivatives and re-streaked on SD medium lacking Trp, Leu, Ade, His containing X-a-Gal and aureobasidin A.

图 3 体内试验验证 RpoE2 和 anti-sigma 因子之间的互作

Fig. 3 *In vivo* association between RpoE2 and its anti-sigma factor

### 2.3 $\Delta rpoE2$ 缺失株对应激反应不敏感

在应激环境中 (氧化应激、外膜应激、抗菌肽应激和 pH 应激), 和野生株相比,  $\Delta rpoE2$  缺失株的抑菌环直径没有显著的差别, 这说明 *rpoE2* 与牛布鲁氏菌 2308 株耐受上述应激环境无关 (图 4)。

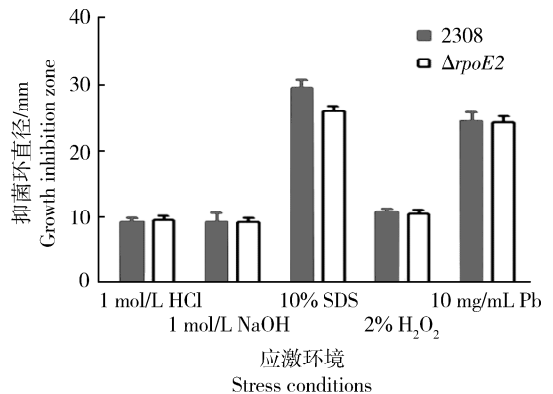


图 4 *rpoE2* 基因缺失后不影响细菌对强氧化性、去污剂、抗菌肽以及极端 pH 的耐受能力

Fig. 4 Deletion of *rpoE2* did not affect the tolerance to oxidative stress, detergents, antimicrobial DW peptides, and extreme pH

如图5所示,在缺铁环境中,野生株和  $\Delta rpoE2$  缺失株在 24 和 48 h 的生长没有显著差异,这证明了  $rpoE2$  与缺铁应激无关。

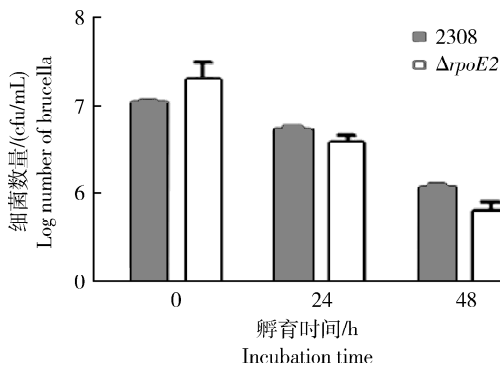


图5 缺失  $rpoE2$  不影响细菌在缺铁环境中的生存能力

Fig. 5 Mutation in  $rpoE2$  did not affect the survival in iron-limitation environment

## 2.4 RpoE2 与细菌毒力不相关

为了研究 RpoE2 是否与牛种布鲁氏菌的毒力相关,首先检测了  $\Delta rpoE2$  缺失株在培养的巨噬细胞内的增殖能力。在鼠源巨噬细胞 J774A.1 中的每个时间点,  $\Delta rpoE2$  缺失株和野生株的增殖情况基本相同(图6)。

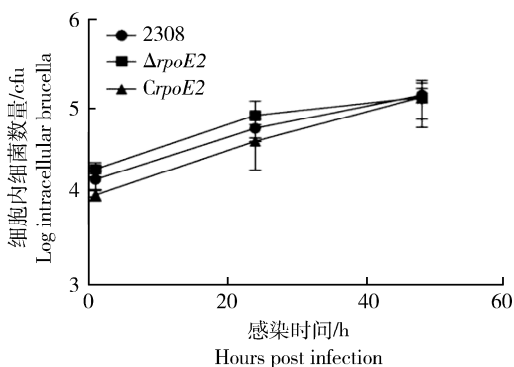


图6 2308、 $\Delta rpoE2$  和  $CrpoE2$  在 J774A.1 巨噬细胞内的增殖情况

Fig. 6 Multiplication of *B. abortus* 2308,  $\Delta rpoE2$ , and  $CrpoE2$  in J774A.1 macrophages over 48 h

为了评价在体内的毒力,使用  $1 \times 10^5$  cfu/mL 的菌量将  $\Delta rpoE2$  缺失株和 2308 野生株腹腔感染 BALB/c 小鼠。在感染 1 和 4 周后测定脾脏内布鲁氏菌的 cfu。结果表明,感染  $\Delta rpoE2$  缺失株的小鼠脾脏内的细菌量与感染野生株牛种布鲁氏菌 2308 小鼠脾脏内的细菌量没有明显差别(图7)。

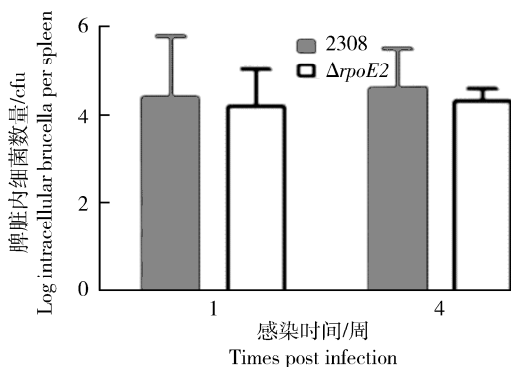


图7 野生株 2308 和  $rpoE2$  缺失株在 BALB/c 小鼠脾脏内的定殖能力

Fig. 7 Virulence of wild type and  $\Delta rpoE2$  strains in the spleens of BALB/c mice

## 3 讨论

尽管首个报道的 ECF16 $\sigma$  因子家族的成员——新月柄杆菌的 SigF,在稳定期参与调控氧化应激反应<sup>[3]</sup>,但是在大豆慢生根瘤菌中,ECF16  $\sigma$  因子(EcfS)缺失株和野生株对氧化应激、外膜应激、pH 应激的反应没有明显区别<sup>[4]</sup>。此外,在羊种布鲁氏菌中敲除  $rpoE2$  同源基因也无法影响细菌对温度和氧化应激的适应能力。这些结果暗示了变形菌门的 ECF16  $\sigma$  因子家族不一定都参与耐受环境应激。

早期的研究中发现,羊种布鲁氏菌的  $rpoE2$  基因(BME II 0072)缺失后,缺失株在小鼠感染模型中的生存能力显著低于亲本菌株<sup>[5]</sup>。在本研究中,牛种布鲁氏菌的  $rpoE2$  基因缺失后,缺失株在巨噬细胞和小鼠感染模型中的生存能力却并无影响。通过对牛种布鲁氏菌和羊种布鲁氏菌的 RpoE2 蛋白编码序列的比对发现,牛种布鲁氏菌的 RpoE2 蛋白开放阅读框(含有 174 个氨基酸)和羊种布鲁氏菌的 RpoE2 蛋白开放阅读框(含有 413 个氨基酸)长度差异显著,对二者的氨基酸序列进行比对发现,牛种布鲁氏菌 RpoE2 蛋白的 1-151 个氨基酸与羊种布鲁氏菌 RpoE2 蛋白的 32-182 个氨基酸的一致性达到 96%。进一步的分析显示牛种布鲁氏菌的 RpoE2 蛋白中仅含有一个 sigma70\_ECF 基序,而羊种布鲁氏菌的 RpoE2 蛋白中不仅含有 sigma70\_r2 基序,还含有 DUF1109 基序。鉴于 DUF1109 基序含有 6 个跨膜螺旋,羊种布鲁氏菌  $rpoE2$  基因缺失株很可能是由于细菌外膜特性受到影响而引起细菌毒力的降低。

为寻找 RpoE2 蛋白的调控靶点,通过生物信息学软件 MEME(<http://meme-suite.org/>)对 RpoE2 蛋白在牛布鲁氏菌 2308 中的调控靶点进行预测,并采用 RT-qPCR 进行了验证。结果得分最高的 15 个预测靶点在 *rpoE2* 基因缺失株和亲本菌株中表达水平无显著差异(数据未展示)。由此分析,一方面可能是由于预测软件的准确度不高;另一方面可能是因为当 ECF sigma 因子在细菌未受到特定环境信号时,其与 anti-sigma 因子紧密结合而无法发挥作用<sup>[7]</sup>。因此,若进一步研究 RpoE2 蛋白的调控靶点,需要首先找到引起 RpoE2 与其 anti-sigma 因子解离的应激信号,才能进一步研究哪些基因的表达受到 RpoE2 的影响。

除了能够调控特定基因的转录,大量研究表明许多细菌的 ECF sigma 因子可以通过对 sRNA 表达的调控影响细菌耐受环境应激的能力和细菌的毒力<sup>[10-11]</sup>。因此,布鲁氏菌的 sRNAs 也是 RpoE2 调控靶点研究的一个重要方向。

基因突变是研究特定基因功能的常规思路。很多研究者都采用了对 ECF sigma 因子进行基因缺失的方法研究它们的功能<sup>[12-14]</sup>。在本研究中也还是将 *rpoE2* 基因进行敲除后对其功能进行了一系列的研究,但未发现典型的表型变化,这有可能是由于某些代谢途径或者调控蛋白与 RpoE2 蛋白存在着功能上的冗余。值得注意的是 Boechat AL 等过表达了铜绿假单胞菌的 ECF sigma 因子 SigX,发现该因子与细菌的脂肪酸合成密切相关<sup>[15]</sup>。因此,通过过表达 *rpoE2* 基因也是未来研究其功能的一个新的途径。

## 参考文献 References

- [1] Lonetto M A, Brown K L, Rudd K E, Buttner M J. Analysis of the *Streptomyces coelicolor* sigE gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1994, 91(16):7573-7577
- [2] Staron A, Sofia H J, Dietrich S, Ulrich L E, Liesegang H, Mascher T. The third pillar of bacterial signal transduction: Classification of the extracytoplasmic function (ECF) sigma factor protein family[J]. *Molecular Microbiology*, 2009, 74(3):557-581
- [3] Alvarez-Martinez C E, Baldini R L, Gomes S L. A *caulobacter crescentus* extracytoplasmic function sigma factor mediating the response to oxidative stress in stationary phase[J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(5):1835-1846
- [4] Stockwell S B, Reutimann L, Guerinet M L. A role for *Bradyrhizobium japonicum* ECF16 sigma factor EcfS in the formation of a functional symbiosis with soybean [J]. *Molecular plant-microbe interactions*, 2012, 25(1):119-128
- [5] Delory M, Hallez R, Letesson J J, De Bolle X. An RpoH-like heat shock sigma factor is involved in stress response and virulence in *Brucella melitensis* 16M [J]. *Journal of Bacteriology*, 2006, 188(21):7707-7710
- [6] Ferooz J, Lemaire J, Delory M, De Bolle X, Letesson J J. RpoE1, an extracytoplasmic function sigma factor, is a repressor of the flagellar system in *Brucella melitensis* [J]. *Microbiology*, 2011, 157(Pt5):1263-1268
- [7] Kim H S, Caswell C C, Foreman R, Roop R N, Crosson S. The *Brucella abortus* general stress response system regulates chronic mammalian infection and is controlled by phosphorylation and proteolysis [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2013, 288(19):13906-13916
- [8] Takahashi-Iniguez T, Garcia-Arellano H, Trujillo-Roldan M A, Flores M E. Protection and reactivation of human methylmalonyl-CoA mutase by MMAA protein [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2011, 404(1):443-447
- [9] Zhang X, Ren J, Li N, Liu W, Wu Q. Disruption of the BMEI0066 gene attenuates the virulence of *Brucella melitensis* and decreases its stress tolerance[J]. *International Journal of Biological Sciences*, 2009, 5(6):570-577
- [10] Papenfort K, Pfeiffer V, Mika F, Lucchini S, Hinton JC, Vogel J. Sigma E-dependent small RNAs of *Salmonella* respond to membrane stress by accelerating global omp mRNA decay[J]. *Molecular Microbiology*, 2006, 62(6):1674-1688
- [11] Klein G, Raina S. Regulated control of the assembly and diversity of LPS by noncoding sRNAs[J]. *BioMed Research International*, 2015, 2015(5):153561
- [12] Thaweethawakorn A, Parks D, So J S, Chang W S. Role of the extracytoplasmic function sigma factor CarQ in oxidative response of *Bradyrhizobium japonicum* [J]. *Journal of Microbiology*, 2015, 53(8):526-534
- [13] Dai J, Wei H, Tian C, Damron F H, Zhou J, Qiu D. An extracytoplasmic function sigma factor-dependent periplasmic glutathione peroxidase is involved in oxidative stress response of *Shewanella oneidensis* [J]. *BMC Microbiology*, 2015, 15:34
- [14] Casonato S, Provvedi R, Dainese E, Palù G, Manganelli R. *Mycobacterium tuberculosis* requires the ECF sigma factor SigE to arrest phagosome maturation [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9):e108893
- [15] Boechat A L, Kaihami G H, Politi M J, Lépine F, Baldini R L. A novel role for an ECF sigma factor in fatty acid biosynthesis and membrane fluidity in *Pseudomonas aeruginosa* [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12):e84775